

*На правах рукописи*

Анисимова Ирина Николаевна

**РОЛЬ P2Y – РЕЦЕПТОРОВ  
В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИМОСТИ МИОКАРДА КРЫС  
В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

**03.03.01-физиология**

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена на кафедре анатомии, физиологии и охраны здоровья человека  
государственного образовательного учреждения высшего профессионального  
образования «Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор

**Аникина Татьяна Андреевна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор

**Гайнутдинов Халил Латыпович**

доктор биологических наук, профессор

**Ситдикова Гузель Фаритовна**

**Ведущая организация:** государственное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Ульяновский  
государственный университет»

Защита состоится «15» ноября 2011г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного  
совета Д 212.078.02. при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный  
университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского  
при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу:  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУВПО  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет» [www.ksu.ru](http://www.ksu.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.м.н., профессор

Зефилов Т.Л.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Внутриклеточные пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды (АТФ и УТФ) выполняют роль источника энергии, участвуют в биосинтезе рибонуклеиновых кислот, обеспечивая жизнедеятельность клетки. Установлено, что АТФ и уридин 5'-трифосфорная кислота (УТФ) находятся в везикулах вместе с основным медиатором и участвуют в передаче нервных импульсов, выполняя функции котрансммиттера (Burnstock and Kennedy, 1986; Burnstock, 1989, 1990, 2006, 2008, 2009; Kugelgen, 1991).

Свое влияние АТФ и УТФ реализуют через P2X и P2Y-рецепторы, разнообразие которых превышает все известные подтипы рецепторов для «классических» нейромедиаторов и гормонов (Зиганшин и др., 1999, 2007; Гиниатуллин, 1998; Гиниатуллин и др., 2005; Аникина, Ситдилов, 2011. Yang et al., 1994; Ralevic and Burnstock, 1998; Ralevic, 2008; Domingo et al., 2010). Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды как сигнальные молекулы при взаимодействии с рецепторами осуществляют пролиферацию, дифференциацию, развитие, регенерацию и апоптоз клеток (Burnstock., 2009).

Присутствие внеклеточной УТФ в сердце считается доказанным, и несколько подтипов P2Y- рецепторов активируются пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами (Vassort, 2001). Метаболизм пиримидиновых нуклеотидов в сердце, к которым относится УТФ, изучен мало. Известно, что содержание пиримидиновых нуклеотидов в сердце ниже по сравнению с пуриновыми нуклеотидами и соотношение АТФ и УТФ составляет 1:10 (Vassort, 2001) или 1:16 (Lazarowski, 2003). Показано, что уровень АТФ и УТФ в плазме значительно коррелирует между собой, что указывает на совместное освобождение этих нуклеотидов (Wihlborg et al., 2006).

В литературе показано разнонаправленное влияние УТФ на деятельность сердца. Отмечено снижение и увеличение силы сокращения, появление двойного эффекта сократимости миокарда при добавлении УТФ (Рычков, 2007; Frolidi et al., 1995; Vassort, 2001; Kugelgen, 2006; Talasila, 2009).

Онтогенетический аспект пуринергической регуляции сердца рассматривался только на взрослых организмах и в период их неонатального развития (Webb et al., 1996; Bogdanov et al., 1998; Hansen et al., 1999; Cheung et al., 2003). Экспрессия P2Y-рецепторов определяется на 11-й день эмбрионального развития крыс в сердце, скелетной

мускулатуре, периферической и центральной нервной системе, легких, печени, когда большинство органов еще не сформированы и функционально не активны (Cheung and Burnstock, 2003). Показано, что у крыс УТФ вызывает рост неонатальных кардиомиоцитов (Pham et al., 2003).

Многие аспекты функционирования P2Y-рецепторов на важнейших этапах раннего постнатального онтогенеза остаются малоизученными, а эффекты УТФ отличаются в различных тканях и на разных этапах онтогенеза (Vassort, 2001). Методами иммуногистохимии и ПЦР показано присутствие P2Y<sub>1,2,4,6,11,13,14</sub> - подтипов рецепторов в целом сердце, на отдельных кардиомиоцитах (Webb et al., 1996; Vassort, 2001; Burnstock, 2009), сердечных миофибробластах (Zheng et al., 1998; Talasila et al., 2009), эндотелии и гладкомышечных стенках сосудов (Wang et al., 2002). Экспрессия P2Y-рецепторов в миокарде меняется в онтогенезе и усиливается для P2Y<sub>1,2,6</sub>- подтипа рецепторов (Webb et al., 1996).

Однако, нет данных, подтверждающих участие P2Y – рецепторов в регуляции сократимости миокарда крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза в условиях незрелости регуляторных влияний на сердце и разных этапов биологического созревания организма.

Актуальность проблемы возрастает и в связи с установленным кардиопротекторным влиянием АТФ и УТФ при гипоксии, инфаркте миокарда, аритмии, ишемии сердца, сопровождающихся гибелью клеток и выходом АТФ и УТФ во внеклеточную среду с последующей активацией P2- пуринорецепторов. (Ninomiya et al., 2002b; Wee et al., 2007). АТФ и УТФ оказывают влияние на миофибробласты, которые играют важную роль в процессах восстановления миокарда при сердечно-сосудистых заболеваниях (Yitzhaki et al., 2005, 2006; Talasila et al., 2009).

### **Цель и задачи исследования**

Цель: исследовать роль УТФ и разных подтипов P2Y - рецепторов в регуляции сократимости миокарда крыс в постнатальном онтогенезе.

В соответствии с этой целью были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить влияние УТФ разной концентрации на сократительную активность миокарда предсердий и желудочков у крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.
2. Определить влияние неселективного блокатора P2Y - рецепторов PPADS на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста

3. Изучить влияние неселективной блокады P2Y - рецепторов PPADS на эффект действия УТФ у крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.

4. Определить влияние селективного блокатора реактива голубого-2 на сократимость миокарда у крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.

5. Изучить влияние селективной блокады P2Y<sub>4</sub> подтипа рецепторов реактивом голубым-2 на эффект действия УТФ у крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. УТФ оказывает отрицательный инотропный эффект на миокард предсердий и желудочков крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста. В наибольшей степени ингибирующий эффект УТФ на сократимость миокарда наблюдается у 21-суточных крысят.

2. Ингибирующий инотропный эффект УТФ у 7-, 21-суточных животных реализуется через P2Y<sub>4</sub> рецепторы, а у 100-суточных животных через P2Y<sub>4</sub> и P2Y<sub>2</sub> рецепторы.

#### **Научная новизна**

В диссертационной работе впервые проведено изучение влияния УТФ на сократимость миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе. В работе впервые было установлено, что агонист P2Y<sub>2,4,6</sub> подтипов рецепторов УТФ вызывает уменьшение силы, скорости сокращения и расслабления миокарда предсердий и желудочков крыс 7-100-суточного возраста. Внеклеточная УТФ оказывает модулирующее влияние на сократимость миокарда в микро- и наномолярных концентрациях.

Получены новые данные о возрастных особенностях инотропии миокарда на действие УТФ. У 21-суточных крысят реакция силы, скорости сокращения и расслабления на влияние агониста больше по сравнению с новорожденными животными.

Впервые выявлено наличие собственного действия блокаторов P2Y-рецепторов PPADS и реактива голубого-2 на амплитудно-временные характеристики сократимости миокарда крыс разного возраста. PPADS оказывает разнонаправленное действие на исследуемые параметры сократимости миокарда крыс 7-, 21 и 100-суточного возраста. У 21-суточных крысят в миокарде желудочков PPADS вызывает положительный инотропный и люзитропный эффекты в сократимости миокарда.

Реактив голубой-2 увеличивает амплитудно-временные характеристики сократимости миокарда всех возрастных групп, в большей степени у 21-суточных крысят.

Проведенные исследования с использованием разнообразных блокаторов P2Y-рецепторов позволили установить подтипы рецепторов, участвующих в ингибирующем действии УТФ. У 100-суточных животных инотропная реакция миокарда на добавление УТФ реализуется при участии P2Y<sub>2</sub> подтипа рецепторов.

Доказано, что P2Y<sub>4</sub> подтип рецепторов участвует в реализации отрицательного инотропного эффекта УТФ во всех возрастных группах и имеет более выраженное модулирующее влияние на сократимость миокарда крыс 100-суточного возраста.

### **Научно - практическая ценность**

Полученные экспериментальные данные значительно расширяют и дополняют наши представления о пуриnergической регуляции инотропной функции сердца, возрастных особенностях функциональной активности разных подтипов P2Y-рецепторов в различные периоды постнатального онтогенеза.

Полученные данные можно использовать при трактовке результатов исследований по физиологии сердца в зависимости от возраста животных. Результаты работы можно использовать при чтении лекций и факультативных курсов по физиологии. Материал исследований представляет интерес для специалистов по физиологии и кардиологии.

### **Личный вклад диссертанта**

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку экспериментальных данных и оформление публикаций.

### **Достоверность полученных данных**

Достоверность полученных данных подтверждалась использованием достаточного объема экспериментальных исследований, конкретной постановкой и решением поставленных задач и статистической обработкой полученных результатов.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях и форумах: VII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009); Международной конференции «Физиология развития человека» Института возрастной физиологии РАО (Москва, 2009); научных конференциях молодых ученых и

специалистов ТГГПУ (Казань, 2009-2011); XXI Съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010); X Всероссийской научно-теоретической конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма» (Казань, 2008, 2010); Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды» (Санкт-Петербург, 2010); конференции молодых ученых «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды» (Санкт-Петербург, 2010); XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2011» (Москва, 2011), на заседаниях кафедры анатомии, физиологии и охраны здоровья человека ТГГПУ (Казань, 2008-2011).

### **Реализация результатов исследования**

По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация объемом 114 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация содержит 16 таблиц и 27 рисунков. Список цитируемой литературы включает 231 источник, из них 42 отечественных и 189 иностранных авторов.

## **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Исследования проведены на 270 разнополых лабораторных беспородных белых крысах стадного разведения. Исследовали 3 возрастные группы животных: 7-, 21- и 100-суточного возраста.

Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* изучали на полосках предсердий и желудочков. Определение реакции сократительной функции миокарда на действие агонистов проводили на установке "PowerLab" ("ADInstruments") с датчиком силы "MLT 050/D" ("ADInstruments"). Запись кривой регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения "Chart 5.0". Рассчитывали абсолютные значения силы сокращения в граммах и общую длительность изометрического сокращения полосок миокарда в секундах, а также оценивали процент изменения на действие агониста в процентах от исходных показателей, которые принимали за 100%.

Из правого желудочка и предсердия при помощи специальных ножниц и пинцетов препарировали полоски. Длина полосок составляла 1,5-2 мм, ширина не превышала 1мм. Препарат фиксировали вертикально одним концом к датчику силы, другим — к точке опоры, затем каждый препарат погружали в отдельный резервуар объемом 5 мл, в который подавался рабочий раствор. Состав раствора Кребса (в моль/л): NaCl- 8г; KCl- 0,3г; CaCl<sub>2</sub>- 3 мл; MgSO<sub>4</sub> –0,5 мл; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- 0,04г; глюкоза – 2г; Trizma HCl- 2.4-3.9 моль/л; Trizma base- 0.25 моль/л (Sigma). Раствор постоянно аэрировали карбогеном 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, pH поддерживали в пределах 7.3-7.4.

После погружения препаратов в резервуары следовал "период приработки" в течение 40-60 мин, в ходе которой мышечным полоскам постепенно придавалось оптимальное натяжение. По окончании приработки 10 мин регистрировали исходные параметры сокращения. Затем в течение 30 мин. Регистрировали сократимость миокарда при добавлении в рабочий раствор агониста одной из концентраций. Агонист P2Y-рецепторов УТФ добавляли в различных концентрациях и оценивали изменения сокращений полосок миокарда крыс. По окончании стимуляции агонистами препараты трехкратно отмывали рабочим раствором в течение 10 мин, затем регистрировали исходные показатели для каждой последующей дозы. Для изучения влияния блокаторов P2Y – рецепторов PPADS и реактива голубого-2 оценивали изменения сокращений полосок миокарда в течении 1 часа. Влияние УТФ на амплитуду сокращения при блокаде P2Y – рецепторов записывали в присутствии PPADS или реактива голубого-2, затем добавляли на 20 минут УТФ и записывали 30 минут.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Влияние УТФ на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе.**

У каждого подтипа P2-рецепторов существуют наиболее и наименее чувствительные к нему агонисты. Известно, что УТФ является агонистом P2Y<sub>2,4,6</sub> подтипов пуринорецепторов.

Определение концентрации внеклеточной УТФ показало, что в сердце содержание УТФ в 10-16 раз меньше, чем АТФ (Vassort, 2001; Lazarowski et al., 2003). Известно, что концентрация внеклеточной АТФ соответствует микромолярной, следовательно, содержание внеклеточной УТФ составляет 10μM. Поэтому для изучения дозозависимого эффекта мы выбрали диапазон концентраций УТФ от 10<sup>-6</sup> до 10<sup>-10</sup>М.



Экзогенная УТФ в концентрации  $10^{-10}$ - $10^{-6}$ М вызывает отрицательный инотропный эффект у 7-, 21- и 100- суточных животных, как в предсердиях, так и в желудочках (рис. 2).

У 7 –суточных крыс УТФ в концентрации  $10^{-6}$ М уменьшает силу сокращения миокарда на  $5,9 \pm 1,4\%$  в предсердиях и на  $8,4 \pm 2,4\%$  в желудочках, что является достоверным по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ). В концентрации  $10^{-7}$ М при действии агониста сила сокращения миокарда уменьшается на  $7,6 \pm 2,3\%$  в предсердиях и на  $6,9 \pm 1,3\%$  в желудочках ( $p < 0,05$ ). УТФ в концентрации  $10^{-8}$ М в этом же возрасте снижает силу сокращения миокарда на  $2,6 \pm 1,1\%$  в предсердиях и на  $6,0 \pm 1,1\%$  в желудочках ( $p < 0,05$ ). УТФ в концентрации  $10^{-10}$ М снижает силу сокращения миокарда на  $5,2 \pm 0,8\%$  в предсердиях и на  $6,3 \pm 1,3\%$  в желудочках ( $p < 0,05$ ) (табл. 1А, 1Б).

У 21-суточных крысят УТФ в концентрации  $10^{-10}$ М уменьшает силу сокращения препарата на  $19,4 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,05$ ) в предсердиях и на  $22 \pm 3,4\%$  в желудочках по сравнению с исходной ( $p < 0,05$ ). Агонист в концентрации  $10^{-8}$ М,  $10^{-7}$ М и  $10^{-6}$ М в предсердиях снижает силу сокращения миокарда на  $17,3 \pm 2,2\%$ ,  $20,0 \pm 1,7\%$  ( $p < 0,05$ ) и  $15,0 \pm 2,7\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ). УТФ в концентрации  $10^{-8}$ М и  $10^{-7}$ М в желудочках уменьшает сократительную активность миокарда на  $17,7 \pm 2,7\%$  и  $13,4 \pm 2,1\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ). А концентрация  $10^{-6}$ М вызывает незначительные изменения силы сокращения (рис. 1) (табл. 1А, 1Б).

У 100- суточных крыс УТФ выше названных концентраций также приводит к развитию отрицательной инотропии. Максимальный сократительный эффект УТФ у взрослых крыс возникает при концентрациях  $10^{-10}$ М и  $10^{-6}$ М в предсердиях на  $20,6 \pm 5,4\%$  и  $19,3 \pm 4,5\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ). В желудочках  $10^{-6}$ М снижает силу сокращения на  $15,7 \pm 1,4$  ( $p < 0,05$ ), а концентрация УТФ  $10^{-10}$ М в желудочках не изменяет силу сокращения. Агонист в концентрации  $10^{-8}$ М снижает силу сокращения в предсердиях на  $13,0 \pm 1,4\%$ , а в желудочках на  $12,8 \pm 1,9\%$  ( $p < 0,05$ ). УТФ в концентрации  $10^{-7}$ М уменьшает сократительную активность миокарда предсердий на  $11 \pm 2,9\%$ , а в желудочках на  $15,4 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,05$ ) (табл. 1А, 1Б).

Таким образом, физиологические концентрации внеклеточной УТФ ( $10^{-8}$  и  $10^{-7}$ М) вызывают достоверно больший ингибирующий эффект в сократительной активности миокарда предсердий и желудочков крыс 21 – и 100- суточных животных, по сравнению с 7-суточными ( $p < 0,001$ ).

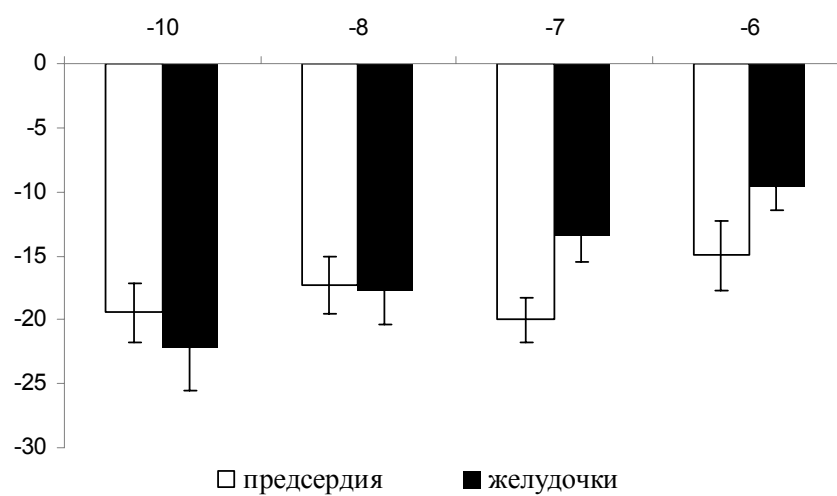


Рис.1. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс 21-суточного возраста.

Примечание:\* - достоверность по сравнению с исходным значением \* $p < 0,05$

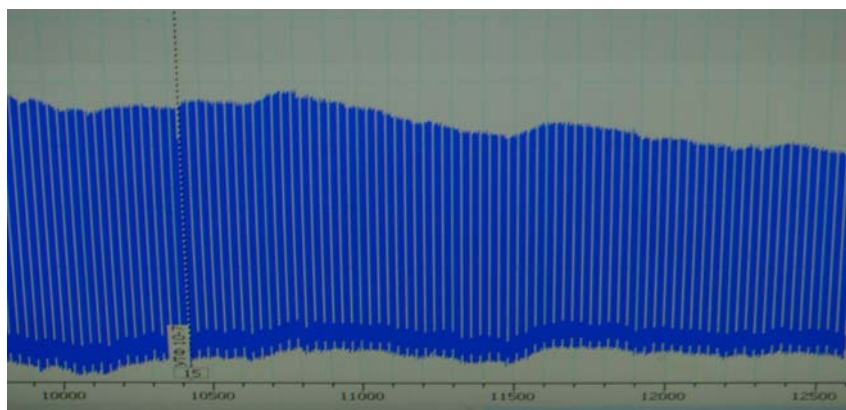


Рис. 2. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда крыс 21-суточного возраста

Таблица 1А

Влияние УТФ на амплитудно-временные показатели сократимости миокарда 7-, 21- и 100- суточных крыс

Возраст	Концентрация агониста, М		Сила сокращения, исх. (г)	Сила сокращения, мах. (г)	Длительность сокращения, исх. (с)	Длительность сокращения, мах. (с)	Время сокращения, исх. (с)	Время сокращения, мах. (с)
7 дней	УТФ $10^{-7}$	предсердие	0,181±0,063	0,169±0,060*	1,413±0,106	1,398±0,101	0,479±0,015	0,467±0,014
		желудочек	0,204±0,023	0,191±0,022*	1,305±0,031	1,294±0,026	0,480±0,006	0,483± 0,003
	УТФ $10^{-8}$	предсердие	0,162±0,032	0,156±0,031*	1,146±0,107	1,128 ±0,108	0,454±0,009	0,447±0,009
		желудочек	0,242±0,031	0,228±0,032*	1,277±0,020	1,294±0,027	0,402±0,062	0,392±0,060
21 день	УТФ $10^{-7}$	предсердие	0,077±0,021	0,063±0,018*	0,683±0,113	0,685±0,118	0,322±0,034	0,348±0,053
		желудочек	0,091±0,023	0,079±0,021*	0,909±0,106	0,896±0,104	0,397±0,012	0,388±0,009
	УТФ $10^{-8}$	предсердие	0,172±0,067	0,147±0,060*	0,696±0,084	0,703±0,088	0,335±0,028	0,343±0,028
		желудочек	0,130±0,042	0,109±0,036*	0,922±0,105	0,902±0,103	0,416±0,024	0,339±0,021
100 дней	УТФ $10^{-7}$	предсердие	0,128±0,023	0,116±0,022*	0,678±0,082	0,668±0,080	0,328±0,10	0,318±0,008
		желудочек	0,109±0,019	0,094±0,018*	1,224±0,229	1,193±0,224	0,425±0,021	0,417±0,019
	УТФ $10^{-8}$	предсердие	0,170±0,024	0,148±0,022*	0,601±0,005	0,597±0,002	0,312±0,004	0,308±0,002
		желудочек	0,155±0,037	0,134±0,032*	1,300±0,109	1,260±0,102	0,423±0,007	0,413±0,006

Примечание: \* - достоверность по сравнению с исходным значением:  $p < 0,05$

Таблица 1Б

Влияние УТФ на амплитудно-временные показатели сократимости миокарда 7-, 21- и 100- суточных крыс

Возраст	Концентрация агониста, М		Время расслабления, исх. (с)	Время расслабления, мах. (с)	Скорость сокращения, исх. (с/т)	Скорость сокращения, мах. (с/т)	Скорость расслабления, исх. (с/т)	Скорость расслабления, мах. (с/т)
7 дней	УТФ $10^{-7}$	предсердие	0,948±0,192	0,929±0,083	0,192±0,034	0,186±0,033*	0,389±0,109	0,355±0,100*
		желудочек	0,826±0,024	0,825±0,025	0,219±0,031	0,202±0,027*	0,407±0,050	0,380±0,045*
	УТФ $10^{-8}$	предсердие	0,834±0,017	0,825±0,016	0,172±0,023	0,155±0,022*	0,288±0,027	0,258±0,024*
		желудочек	0,630±0,149	0,620±0,146	0,195±0,034	0,183±0,032*	0,353±0,064	0,333±0,058*
21 день	УТФ $10^{-7}$	предсердие	0,376±0,096	0,377±0,098	0,146±0,016	0,128±0,016*	0,161±0,021	0,131±0,018*
		желудочек	0,487±0,112	0,473±0,107	0,187±0,023	0,168±0,020*	0,212±0,030	0,192±0,026*
	УТФ $10^{-8}$	предсердие	0,451±0,099	0,442±0,095	0,264±0,092	0,232±0,089*	0,290±0,092	0,244±0,072*
		желудочек	0,569±0,093	0,546±0,086	0,135±0,020	0,115±0,018*	0,169±0,017	0,137±0,013*
100 дней	УТФ $10^{-7}$	предсердие	0,355±0,072	0,353±0,071	0,541±0,079	0,472±0,072*	0,522±0,058	0,477±0,056*
		желудочек	0,799±0,210	0,769±0,201	0,205±0,051	0,181±0,047	0,317±0,070	0,287±0,070
	УТФ $10^{-8}$	предсердие	0,289±0,001	0,288±0,001	0,527±0,070	0,464±0,053*	0,488±0,062	0,430±0,049*
		желудочек	0,877±0,104	0,853±0,099	0,272±0,058	0,258±0,054*	0,517±0,102	0,448±0,079*

Примечание: \* - достоверность по сравнению с исходным значением:  $p < 0,05$

## **Влияние PPADS на амплитудно-временные характеристики сократимости миокарда крыс 7-100 суточного возраста.**

Фармакологические исследования с использованием различных агонистов и антагонистов рецепторов позволят идентифицировать подтип P2Y - рецепторов.

Существуют противоречивые данные о селективности блокаторов P2Y-рецепторов. По мнению многих исследователей, блокаторы P2Y - рецепторов обладают видовой и тканевой специфичностью. В настоящее время установлено, что PPADS является антагонистом P2Y<sub>1</sub> и возможно, P2Y<sub>6</sub> подтипов рецепторов (Kugelgen et al., 2000, Kugelgen, 2006; Wee et al., 2007). В литературе имеются данные, где показано отсутствие влияния PPADS на P2Y<sub>4</sub> подтип рецепторов крыс (Collo et al., 1996; Townsend-Nicholson et al., 1999; Wildman et al., 2003; Kugelgen, 2000, 2006). По данным других авторов PPADS умеренно блокирует P2Y<sub>2,6,11,13</sub> подтипы рецепторов (Vassort, 2001; Kugelgen, 2005).

Изучали влияние PPADS на параметры сократимости миокарда предсердий и желудочков крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста. Блокатор добавляли в концентрации 30μM (Burnstock, 2006).

Регистрацию действия препарата на амплитудно-временные характеристики сократимости миокарда изучали в течение 60 минут. Стабилизация показателей сократимости после добавления блокатора наступает к 10 минуте и не меняется в последующие 50 минут.

У новорожденных крысят добавление PPADS вызывает положительный инотропный эффект, который в предсердиях составляет  $7,3 \pm 0,7\%$ , а в желудочках  $5,3 \pm 1,0\%$  ( $p < 0,05$ ).

У 21-суточных крыс в предсердиях исследуемый блокатор снижает амплитуду сокращения на  $7,4 \pm 1,4\%$  ( $p < 0,05$ ). После инкубации миокарда желудочков с PPADS наблюдается увеличение амплитуды сокращения на  $47,2 \pm 4,7\%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходной. Из исследуемых временных параметров инотропии миокарда, в большей степени увеличиваются скорость сокращения и скорость расслабления миокарда желудочков на  $44,2 \pm 3,5\%$  и  $40,8 \pm 8,9$  соответственно ( $p < 0,05$ ). Такие показатели как длительность, время сокращения и расслабления изменяются не значительно.

У взрослых крыс блокатор оказывает отрицательный инотропный эффект. В предсердиях сила сокращения уменьшается на  $8,9 \pm 1,7\%$ , а в желудочках на  $6,8 \pm 1,1\%$  по сравнению с исходной ( $p < 0,05$ ) (рис.3).

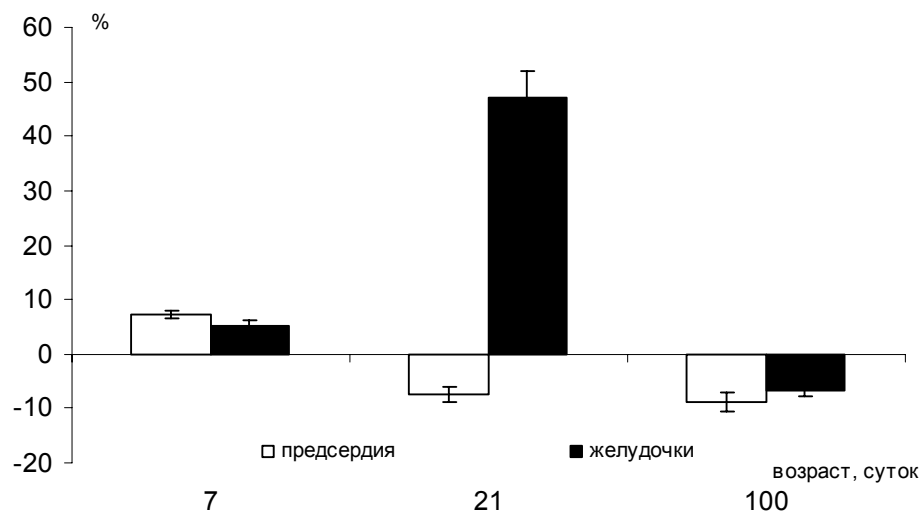


Рис.3. Влияние PPADS на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс 7-, 21- и 100 - суточного возраста

Примечание:\* - достоверность по сравнению с исходным значением \* $p < 0,05$

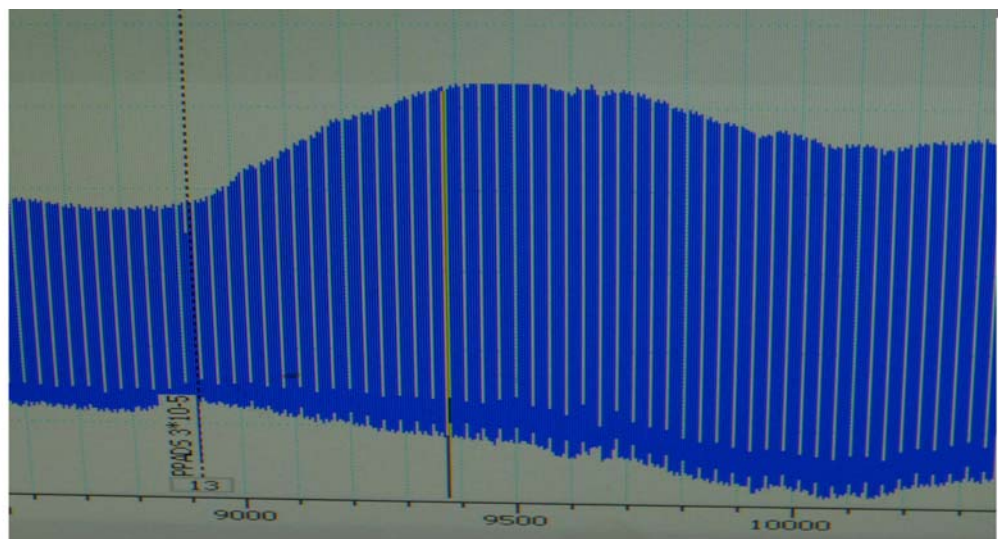


Рис. 4. Влияние PPADS на амплитудно-временные характеристики сокращения миокарда желудочков крыс 21-суточного возраста.

Следовательно, PPADS оказывает разнонаправленное действие на параметры инотропии миокарда крыс разного возраста. У новорожденных крысят, как в предсердиях, так и в желудочках блокатор оказывает положительный инотропный эффект. У 21-суточных крыс антагонист приводит к развитию положительного инотропного и лизитропного действия на миокард желудочков. У 100- суточных животных наблюдается уменьшение силы сокращения миокарда предсердий и желудочков.

### Влияние УТФ на фоне PPADS на сократимость миокарда крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.

Для определения подтипа P2Y-рецепторов, участвующих в эффектах УТФ провели серию экспериментов по определению влияния УТФ на фоне блокатора PPADS. Исследовали влияние наиболее эффективных концентраций УТФ на силу сокращения миокарда. Для 7- и 100-суточных крысят добавляли УТФ в концентрации  $10^{-8}$ М, а для 21-суточных -  $10^{-7}$ М.

У новорожденных крысят в контроле агонист оказывает отрицательный инотропный эффект, который составляет в предсердиях  $7,0 \pm 0,8\%$ , а в желудочках -  $4,3 \pm 0,7\%$ . На фоне блокады P2Y<sub>2,6</sub> подтипов рецепторов отрицательный инотропный эффект УТФ сохраняется. В предсердиях он составляет  $4,9 \pm 0,8\%$ , в желудочках  $2,3 \pm 0,5\%$ .

У 21-суточных крысят УТФ в контроле снижает силу сокращения миокарда предсердий на  $15,0 \pm 1,4\%$ , а в желудочках на  $15,7 \pm 0,8\%$ . После инфузии с антагонистом добавление УТФ не изменяет амплитуду сокращения миокарда (рис. 5).

У 100-суточных крыс в контроле УТФ уменьшает силу сокращения желудочков на  $14,5 \pm 1,7\%$ , и предсердий на  $16,6 \pm 0,8\%$ . При блокаде P2Y<sub>2,6</sub> подтипов рецепторов в предсердиях ингибирующий эффект УТФ также сохраняется (рис.6).

Таким образом, при блокаде P2Y<sub>2,6</sub> подтипов рецепторов отрицательный эффект УТФ сохраняется в миокарде предсердий и желудочков всех возрастных групп. Однако, у 100-суточных крыс блокатор PPADS снижает эффект УТФ в миокарде желудочков с 16 до 6% ( $p < 0,05$ ). Следовательно, ингибирующий эффект УТФ у 100-суточных животных в миокарде желудочков реализуется через P2Y<sub>2</sub> подтип рецепторов.

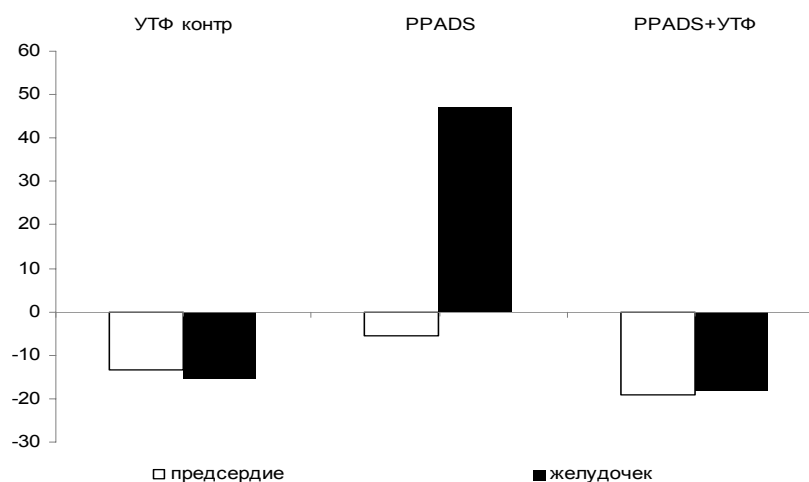


Рис. 5. Влияние УТФ в контроле и при блокаде PPADS на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков у 21-суточных животных.

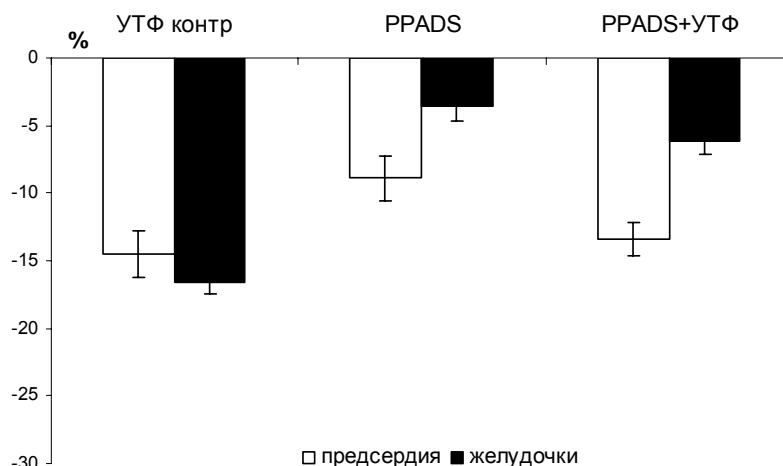


Рис. 6. Влияние УТФ в контроле и при блокаде PPADS на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков у 100- суточных животных.

### **Влияние реактива голубого-2 на сократимость миокарда крыс в онтогенезе.**

Известно, что у крыс реактив голубой-2 блокирует  $P2U_4$  подтип рецепторов в сердце (Bogdanov et al., 1998; Wildman et al., 2003). У крыс этот подтип рецепторов не чувствителен к сурамину и PPADS (Burnstock, 2009). По данным исследования Wee и его сотрудников реактив голубой-2 является эффективным антагонистом, как при низких, так и высоких концентрациях. Реактив голубой -2 добавляли в концентрации 15 микроМ (Burnstock, 2006; Wee et al., 2007).

Реактив голубой является селективным блокатором для  $P2U_4$  подтипа рецепторов в сочетании с УТФ как агонистом этих рецепторов.

В данной серии экспериментов изучали влияние реактива голубого-2 на силу сокращения предсердий и желудочков всех возрастных групп. Инфузия блокатора вызывает положительный инотропный эффект миокарда у 7-100-суточных животных. Увеличение силы сокращения изолированных полосок миокарда на действие препарата происходит постепенно, и стабилизация исследуемых параметров сократимости наблюдается к 15-20 минуте.

У 7-суточных крысят реактив голубой-2 вызывает положительный инотропный эффект в предсердиях на  $16,3 \pm 5,1\%$ , а в желудочках на  $13,3 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,05$ ). У 21-суточных животных наибольший эффект на добавление реактива голубого-2 наблюдался в желудочках и составил  $20,0 \pm 3,9\%$  ( $p < 0,05$ ). В предсердиях он достигал  $15,9 \pm 2,6\%$  ( $p < 0,05$ ). У взрослых крыс антагонист также увеличивает силу сокращения миокарда, но



в меньшей степени. В предсердиях на  $5,9 \pm 1,13\%$  и в желудочках на  $6,0 \pm 1,39\%$  по сравнению с исходной ( $p < 0,05$ ) (рис. 7).

Изучение влияния реактива голубого-2 на сократительную активность миокарда крыс выявило возрастные особенности. Так, у 7- и 21-суточных крысят сила сокращения полосок миокарда предсердий и желудочков на действие блокатора достоверно выше, чем у 100-суточных животных ( $p < 0,05$ ).

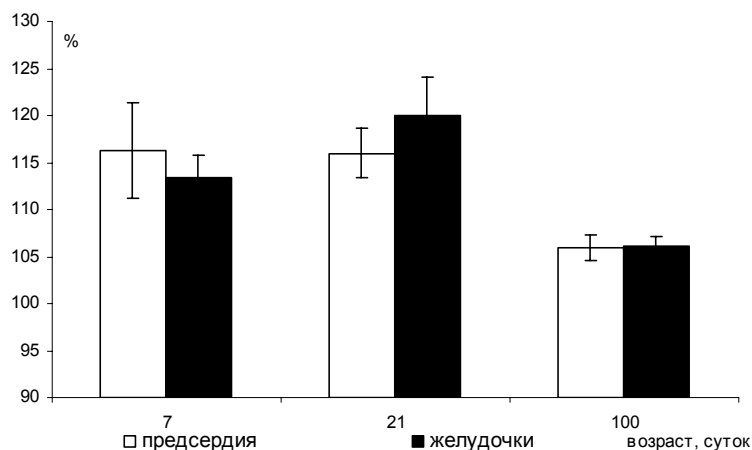


Рис. 7. Влияние реактива голубого-2 на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс 7-, 21- и 100 - суточного возраста

Примечание: \* - достоверность по сравнению с исходным значением  $*p < 0,05$

### **Влияние УТФ на фоне реактива голубого-2 на сократимость миокарда крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.**

Для определения подтипа рецепторов, участвующих в ингибирующих эффектах УТФ провели серию экспериментов по изучению влияния УТФ при блокаде  $P2U_4$  подтипа рецепторов реактивом голубым-2.

Для эксперимента выбрали такие концентрации УТФ, которые вызывают достоверно значимые изменения показателей сократимости, и соответствуют содержанию внеклеточной УТФ.

У 7-суточных крысят в контроле УТФ уменьшает силу сокращений предсердий на  $4,6 \pm 0,8\%$ , а желудочков на  $6,4 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,05$ ). При блокаде  $P2U_4$  подтипа рецепторов отрицательный инотропный эффект УТФ не сохраняется ( $p < 0,05$ ) (рис.8А, 8Б).

У 21-суточных животных УТФ в контроле сила сокращения снижается в предсердиях на  $29,1 \pm 4,8\%$  ( $p < 0,05$ ), в желудочках на  $22,7 \pm 2,9\%$  ( $p < 0,05$ ). При блокаде

P2Y<sub>4</sub> подтипа рецепторов ингибирующий эффект УТФ также не сохраняется ( $p<0,05$ ) (рис. 9А, 9Б).

У 100-суточных крыс на полосках миокарда предсердий сила сокращения уменьшилась на  $15,9\pm 3,5\%$  ( $p<0,05$ ), а желудочков на  $20,3\pm 3,7\%$  ( $p<0,05$ ). При блокаде P2Y<sub>4</sub> подтипа рецепторов ингибирующий эффект УТФ также не сохраняется ( $p<0,05$ ). Введение УТФ на фоне предварительного добавления реактива голубого-2 сохраняет положительный инотропный эффект блокатора ( $p<0,05$ ) (рис. 10).

Таким образом, у 7-, 21- и 100- суточных животных после инкубации миокарда с реактивом голубым-2 отрицательный инотропный эффект УТФ не сохраняется.

У 7- и 21-суточных крысят на фоне блокады реактива голубого-2 введение УТФ приводит к некоторому снижению силы сокращения миокарда предсердий и желудочков, которое однако не достигает контрольных значений УТФ ( $p<0,05$ ).

Таким образом, реализация ингибирующего эффекта УТФ в сократимости миокарда осуществляется через P2Y<sub>4</sub>-подтип рецепторов у крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста. У 100-суточных животных преобладают влияния УТФ с участием P2Y<sub>4</sub> подтипов рецепторов.

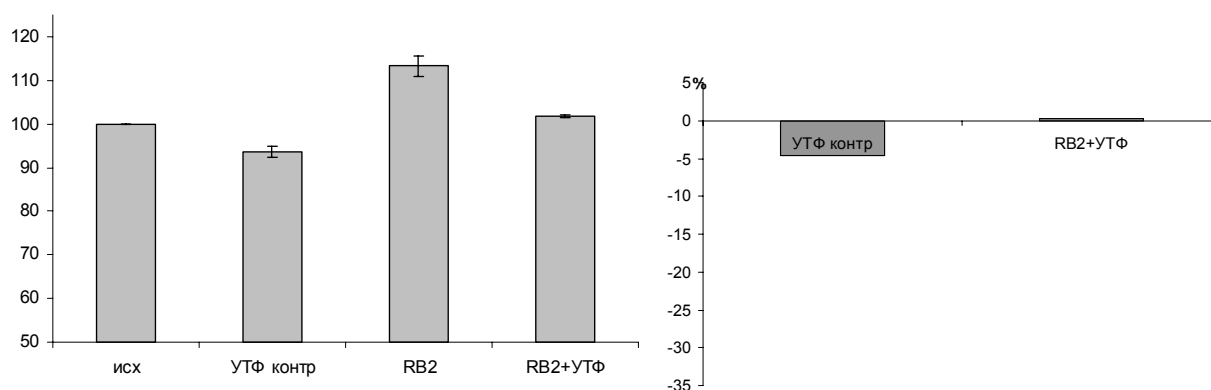


Рис.8А. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда желудочков 7- суточных животных в контроле и при блокаде реактивом голубым-2.

Рис. 8Б. Реакция силы сокращения миокарда желудочков на действие УТФ в контроле и при блокаде реактивом голубым-2 у 7-суточных животных.

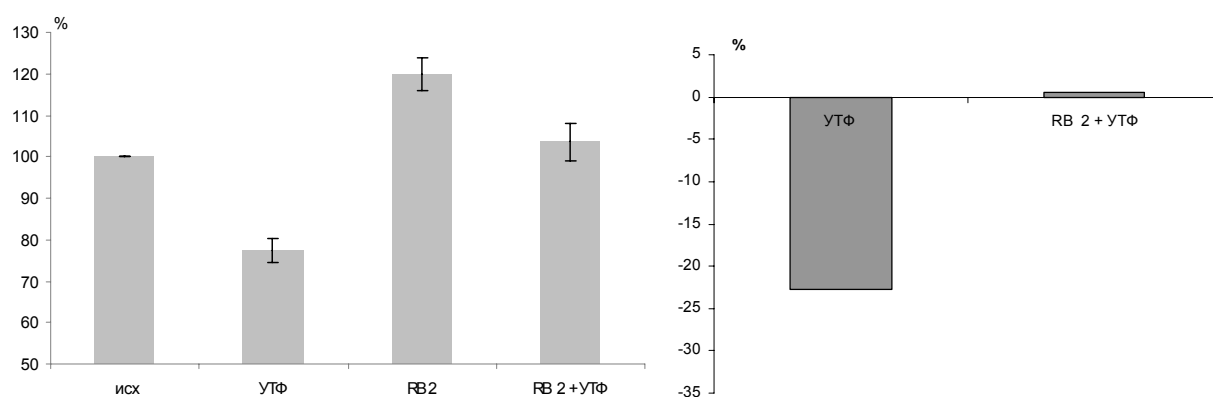


Рис.9А. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда желудочков 21-суточных животных в контроле и при блокаде реактивом голубым-2.

Рис. 9Б. Реакция силы сокращения миокарда желудочков на действие УТФ в контроле и при блокаде реактивом голубым-2 у 21-суточных животных.

Примечание: \* - достоверность по сравнению с контролем \* $p < 0,05$ ,

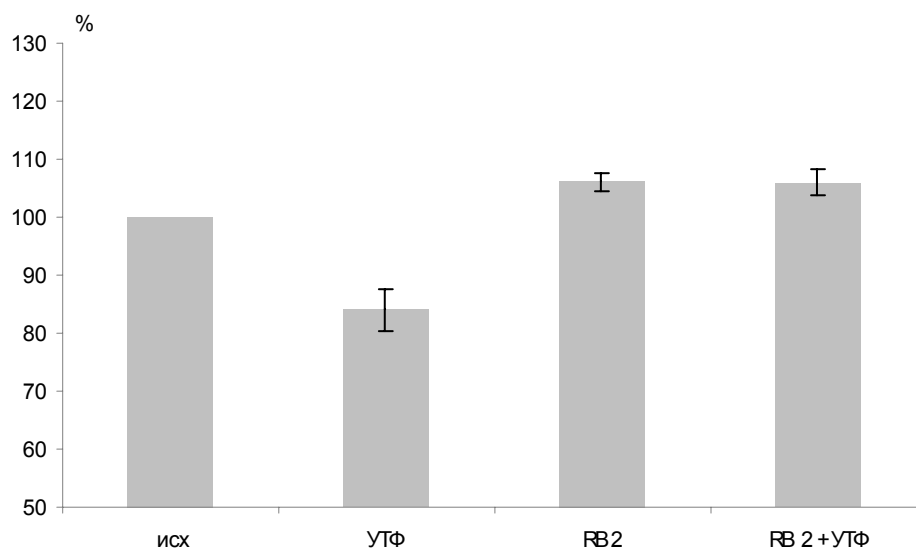


Рис.10. Влияние УТФ на силу сокращения миокарда желудочков в контроле и при блокаде реактивом голубым-2 у 100-суточных животных.

## ВЫВОДЫ

1. УТФ в концентрации  $10^{-6}$ - $10^{-10}$ М оказывает отрицательный инотропный эффект на миокард предсердий и желудочков крыс 7-, 21- и 100-суточного возраста.
2. Реакция миокарда предсердий и желудочков на УТФ у 21-суточных крысят более выражена по сравнению с новорожденными.
3. УТФ в концентрации  $10^{-8}$ М у 7- и 100-суточных и в концентрации  $10^{-7}$ М у 21-суточных уменьшает скорость сокращения и расслабления миокарда предсердий и желудочков.
4. PPADS вызывает разнонаправленное действие на силу сокращения миокарда крыс разного возраста. У 7-суточных крысят блокада P2Y - рецепторов увеличивает, у 100-суточных животных снижает силу сокращения миокарда, у 21-суточных крыс приводит к развитию положительного инотропного и люзитропного эффекта в миокарде желудочков.
5. PPADS не оказывает влияния на отрицательный инотропный эффект УТФ в миокарде предсердий и желудочков всех возрастных групп. У 100-суточных животных PPADS снижает реакцию сократимости миокарда желудочков на УТФ.
6. Реактив голубой-2 оказывает положительный инотропный эффект на миокард предсердий и желудочков 7-, 21- и 100-суточных животных. Реакция сократимости миокарда на антагонист наиболее выражена у 21-суточных крысят.
7. Реактив голубой-2 предотвращает ингибирующий эффект УТФ на сократимость миокарда предсердий и желудочков 100-суточных животных и уменьшает его у 7-и 21-суточных крысят.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ситдилов Ф.Г., Аникина Т.А., **Трофимова И.Н.** Возрастные особенности влияния УТФ на сократительную активность миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе. Вестник ТГГПУ, №3 (21), 2010.- С. 111-115.
2. **Анисимова И.Н.**, Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г. Влияние блокады P2Y-пуринорецепторов на инотропную функцию сердца в онтогенезе. Вестник ТГГПУ, 2011, № 3 (25).- С. 41-45.

3. Аникина Т.А., Зверев А.А., Ситдилов Ф.Г., **Трофимова И.Н.** АТФ модулирует холинергические влияния на сократимость миокарда в зависимости от возраста крыс. IX Всероссийская конференция «Физиологические механизмы адаптации растущего организма», посвященная юбилею проф. Ф.Г. Ситдилова., 2008, с. 17-18
4. Аникина Т.А., **Трофимова И.Н.** Влияние УТФ на сократимость миокарда крыс. Вестник ТГГПУ, 2008, № 4 (15), с. 58-60
5. Аникина Т.А., Зверев А.А., Ситдилов Ф.Г., **Трофимова И.Н.** Пуринорецепторы сердца. Вестник ТГГПУ, 2008, № 4 (15), с. 53-57
6. Ситдилов Ф.Г., Аникина Т.А., Зверев А.А., **Трофимова И.Н.** Участие P2X и P2Y-рецепторов в сократимости миокарда крыс. Всероссийская научно-практическая конференция «Инновационные подходы к естественнонаучным исследованиям и образованию», посвященная юбилею ЕГФ, Казань, 2009, с. 21-23
7. Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., Зверев А.А., **Трофимова И.Н.** Пуринергическая регуляция сердца в постнатальном онтогенезе. Материалы международной конференции «Физиология развития человека». Москва.- 2009.- С. 8-9.
8. Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., Зверев А.А., **Трофимова И.Н.** Пуринорецепторы сердца крыс в онтогенезе. VII Всероссийская конференция с международным участием “Механизмы функционирования висцеральных систем”, посвященная 160-летию со дня рождения И.П. Павлова Санкт-Петербург, 2009, с.29-30
9. Ситдилов Ф.Г., Аникина Т.А., Зверев А.А., **Трофимова И.Н.** Влияние УТФ на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе. Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «Теоретические основы физической культуры». Казань: ТГГПУ, 2009.- С. 155-157
10. **Трофимова И.Н.** Влияние УТФ на сократимость миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе. Сборник тезисов лучших докладов XXX научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященный Году учителя в РФ и РТ «Молодые ученые в научном поиске: выпуск 1. Казань.- ТГГПУ.- С. 79-83.
11. **Трофимова И.Н.**, Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., Константинова И.В. Участие P2Y- пуринорецепторов в сократимости миокарда. Материалы X юбилейной Всероссийской научной конференции с международным участием «Физиологические механизмы адаптации растущего организма».- Казань: ТГГПУ, 2010.- С. 183-185.

12. **Трофимова И.Н.**, Аникина Т.А. Влияние АТФ и УТФ на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе. Тезисы докладов XXI съезда физиологического общества им. И.П.Павлова.- М.-Калуга, 2010.- С. 619.

13. Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., Билалова Г.А., **Трофимова И.Н.** АТФ как модулятор эффектов классических медиаторов в постнатальном онтогенезе. Тезисы докладов XXI съезда физиологического общества им. И.П.Павлова.- М.-Калуга, 2010.- С. 759-760.

14. Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., **Трофимова И.Н.** Участие P2Y- пуринорецепторов в сократимости миокарда крыс в раннем постнатальном онтогенезе. Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. - Санкт-Петербург, 7–9 декабря 2010.- С. 16.

15. **Анисимова И.Н.** Влияние уридин-5'-трифосфата на сократимость миокарда крыс в постнатальном онтогенезе. Тезисы докладов Конференции молодых ученых, посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН «Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды».- СПб.: Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 2010. – С. 7-8.

16. **Анисимова И.Н.** Участие разных подтипов P2Y-рецепторов в сократимости миокарда крыс в постнатальном онтогенезе. Тезисы докладов XVIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011».- Москва, МГУ.-2011.- с. 237-238.

17. Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., **Анисимова И.Н.**, Лохотская Л.А. Роль пуринорецепторов в регуляции деятельности сердца крыс. Тезисы докладов III Съезда физиологов СНГ, Ялта, 2011.- С.

18. Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., Зверев А.А., **Анисимова И.Н.** Пуринергическая регуляция сердца в онтогенезе. Учебное пособие “Избранные главы фундаментальной и восстановительной медицины”.- Казань.- 2011.- С.95-114.